

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 7 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860711

研究課題名(和文) 孤発性のパーキンソン病を反映する新たなモデルマウスの作製及び機能解析

研究課題名(英文) Generation of new model mice that reflect human sporadic parkinson's disease

研究代表者

浅野 剛史 (Asano, Takeshi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：40649167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病は発症機構が完全には解明されていないため、根本的な治療法が確立されていない神経変性疾患の一つである。ヒトの孤発性のパーキンソン病の病態を反映する哺乳類モデルの作製を目的に本研究を行った。パーキンソン病発症の遺伝的要因としてシヌクレインに、環境要因として鉄による酸化ストレスに注目し、これらの発症要因を組み合わせることで孤発性パーキンソン病を反映する新しいモデルマウスの作製・機能解析を行った。作製したマウスでは運動機能に軽微な異常を認め、またシヌクレインの蓄積も部分的に観察されたため、パーキンソン病の病態解明に有用なモデルマウスとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Parkinson's disease is one of the common neurodegenerative diseases. The complete therapy of Parkinson's disease has not been established because the pathogenesis of Parkinson's disease is still unclear. To establish the new mammal models that resembles human Parkinson's disease, we performed this study. We inter-crossed alpha-synuclein Tg mice with IRP2 Tg mice. The double-Tg mice had a little abnormal motor performance. And insoluble alpha-synuclein was observed in some regions in the brain of the double Tg mice. These results suggest that our new mice is useful model for the research of Parkinson's disease.

研究分野：神経内科学

キーワード：alpha-synuclein 酸化ストレス パーキンソン病

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は、振戦や筋固縮、動作緩慢、歩行障害などの運動症状を主症状とし、嗅覚障害や睡眠障害、うつなどの非運動症状も発症する多系統の神経変性疾患である。パーキンソン病は黒質のドパミン産生神経細胞が選択的に傷害されることでドパミン不足が生じ、上記の症状が生ずると考えられている。しかし、パーキンソン病で選択的に黒質のドパミン産生神経細胞が変性し脱落するメカニズムは未だに不明である。そのため、パーキンソン病の完治療法は未だに確立されていない。

パーキンソン病の発症機構は完全には解明されていない。この原因としてヒトの孤発性のパーキンソン病の病態を忠実に反映するような哺乳類のモデル、特にモデルマウスが作製できていないことが挙げられる。これまでに、様々なモデル動物(マウス)が作られているが、孤発性のパーキンソン病を部分的にしか再現できていない。真のパーキンソン病の発症機構の解明のためには、ヒトの孤発性のパーキンソン病の病態を忠実に反映するモデルマウスが必要である。

2. 研究の目的

本研究ではパーキンソン病発症の遺伝的要因として α -シヌクレインに、また発症の環境要因として鉄による酸化ストレスに注目し、新しいパーキンソン病のモデルマウスの作製を試みた。

パーキンソン病患者の病理では、レビー小体と呼ばれる封入体が観察される。このレビー小体の主成分が α -シヌクレインであり、 α -シヌクレインの発現の上昇、 α -シヌクレインの遺伝子の変異、あるいは α -シヌクレインの細胞間の伝播などがパーキンソン病の発症に関すると考えられている。これまでに、我々のグループはヒトの内在性の α -シヌクレインのプロモーター下でヒト α -シヌクレインを発現するトランスジェニック(Tg)マウスを作製していた(Yamakado, 2012)が、軽微な運動機能の変化を示すのみで、パーキンソン病のモデルとならなかった。

鉄は生体に必須の元素であるが、過剰に存在すると毒性を発揮する「諸刃の剣」となる元素である。鉄は酸素との反応性が高く、鉄代謝の異常は活性酸素の産生を介して酸化ストレスの原因となる(Zecca, 2004)。我々はこれまで、鉄代謝制御因子 IRP2 を神経細胞に発現する Tg マウスを作製し、このマウスでは鉄代謝異常により神経細胞で反応性に富んだ 2 価の鉄が増加し、ミトコンドリアに慢性的な酸化ストレスを与え、加齢に伴う神経変性が惹起されることを見いだしていた。

上記の結果から、 α -シヌクレインと鉄という発症要因を組み合わせたマウスを作製し、ヒトの孤発性パーキンソン病を反映す

るモデルマウスの作製・機能解析を行い、最終的にパーキンソン病の発症機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

α -シヌクレインをヒトのプロモーター下で発現するマウス(BAC-SNCA マウス) および脳内で 2 価の鉄が増加して脳内に酸化ストレスが増加するマウス(IRP2 Tg マウス)を交配して上記の目的のモデルマウスを作製した。BAC-SNCA マウスにおける α -シヌクレインの発現は軽微であったので、ホモ Tg マウスを IRP2 のヘテロ Tg マウスと交配した。作製した 2 重 Tg マウス、およびそのコントロールとなるマウスについて、月齢が 6 カ月齢、9 カ月齢、12 カ月齢、18 カ月齢、24 カ月齢のマウスを飼育し、運動機能をはじめとする種々の行動の解析を行った。また解剖により脳を取得し、組織化学的解析(免疫染色など)と生化学的解析(ウエスタンブロットなど)を行い、パーキンソン病の特徴を示すかに関して検討した。

4. 研究成果

交配したマウスのうち 12 カ月齢について様々な行動解析のバッテリーを行ったところ、オープンフィールドテストにおいて 2 重 Tg マウスでは運動初期の行動量に僅かに低下が観察された(図 1A)。さらに、常同的な運動量も低下していた(図 1B)。一方で、垂直方向の運動機能(図 1C)やセンタータイム(図 1D)には影響がなかった。

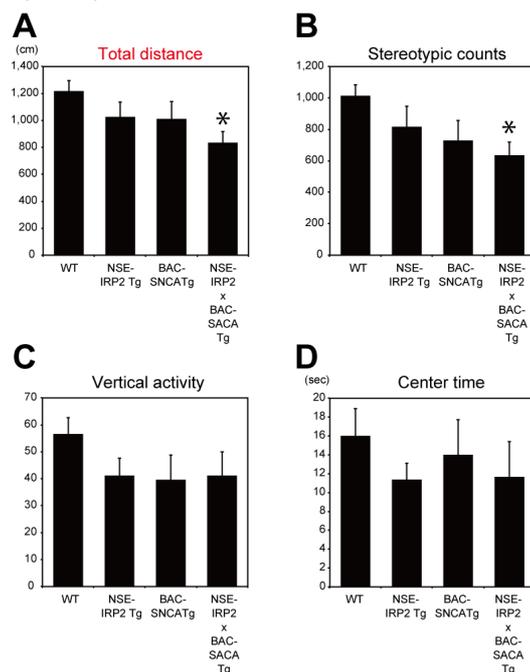


図 1 各遺伝子改変マウスにおけるオープンフィールドテストの結果

以上から、このマウスは部分的にはあるが、運動機能に異常がある可能性が示唆された。6 カ月齢ではこのような表現型が現れなかつ

たことから、加齢が表現型の発症に関与すると考えられた。

次に、組織化学的解析を行った。レビー小体は α -シヌクレインが不溶化して脳内に凝集し封入体となり、タンパク質分解酵素の働きを受けにくいことが知られている。

12 ヶ月齢のマウスの脳のパラフィン切片を用い、プロテナーゼ K で処理後、抗 α -シヌクレイン抗体で染色したところ、中脳などで 2 重 Tg マウスでは染色性が増加しており、 α -シヌクレインが凝集等の構造変化を起こしている可能性が示唆された。

続いて生化学的解析を行った。凝集した α -シヌクレインは界面活性剤に不溶となることが知られていたため、中脳における Triton X-100 に可溶・不要な α -シヌクレインの量を観察した。(図 2)。Triton X-100 に可溶な α -シヌクレインの量は 2 重 Tg マウスで他のマウスと変わらなかった(図 2A)。しかし、Triton X-100 に不溶な α -シヌクレインの量は 2 重 Tg マウスで増加していた(図 2B)。2 重 Tg マウスで、 α -シヌクレインが凝集等の構造変化を起こしている可能性が示唆された。

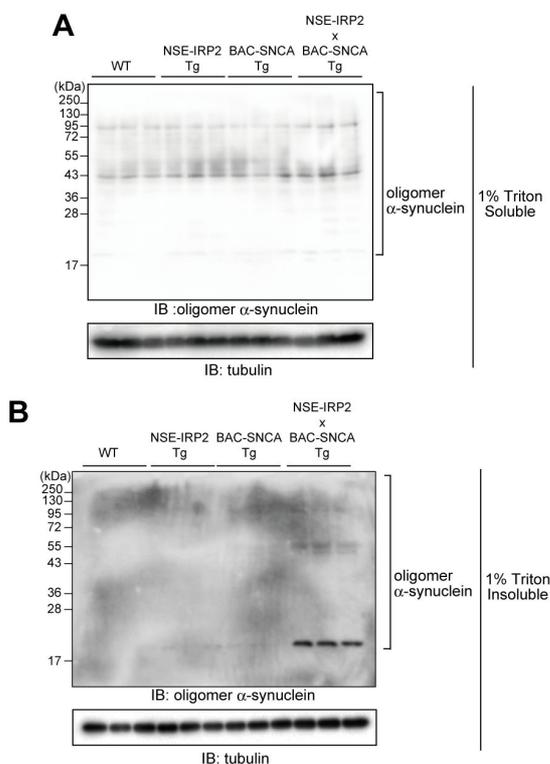


図 2 中脳における α -シヌクレインの可溶性の変化

さらに、ドパミン産生細胞についても解析したところ、12 ヶ月齢で 2 重 Tg マウスではやや減少する傾向にあった。

上記の組織化学的・生化学的な特徴は 12 ヶ月齢より前では見られず、また 12 ヶ月齢より後でも進行している様子は認められなかった。

以上から、作製したマウスはパーキンソン病

を一部を反映するマウスとなることが明らかとなった。今後、さらなる解析によりパーキンソン病の発症機構の解析に有効であると考えられ、治療薬の開発にも役に立つ可能性があると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Immunoreactivity of valosin-containing protein in sporadic amyotrophic lateral sclerosis and in a case of its novel mutant.

Ayaki T, Ito H, Fukushima H, Inoue T, Kondo T, Ikemoto A, Asano T, Shodai A, Fujita T, Fukui S, Morino H, Nakano S, Kusaka H, Yamashita H, Ihara M, Matsumoto R, Kawamata J, Urushitani M, Kawakami H, Takahashi R.

Acta Neuropathol Commun. (2014) 2:172.

2. Possible involvement of iron-induced oxidative insults in neurodegeneration.

Asano T, Koike M, Sakata S, Takeda Y, Nakagawa T, Hatano T, Ohashi S, Funayama M, Yoshimi K, Asanuma M, Toyokuni S, Mochizuki H, Uchiyama Y, Hattori N, Iwai K.

Neurosci Lett. (2015) 19;588:29-35.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. パーキンソン病の治療に向けた α -シヌクレインの転写を抑制する低分子化合物のスクリーニング

浅野 剛史、山門 穂高、高橋 良輔

第 37 回日本神経科学大会、2014 年 09 月 11 日 ~ 2014 年 09 月 13 日、横浜

2. マウスを用いた in vivo におけるゾニサミドの作用機構

浅野 剛史、山門 穂高、高橋 良輔

第 55 回日本神経学会学術大会、2014 年 05 月 21 日 ~ 2014 年 05 月 24 日、福岡

3. Screening of small molecules that down-regulate α -synuclein expression

Takeshi Asano

Alpha-Synuclein: The Gateway to Parkinsonism, 2015 年 02 月 11 日 ~ 2015 年 02 月 13 日

、Innsbruck

4. Involvement of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease

Takeshi Asano

MDS-AOS Basic Scientists Summer School、

2014年07月13日～2014年07月15日、台北

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者:浅野 剛史
()

研究者番号：

(2)研究分担者 なし
(3)連携研究者 なし